IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG DER BIGUANIDE BEI INSULINRESISTENZ

Franz Hiltensperger

1972

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG DER BIGUANIDE BEI INSULINRESISTENZ

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig - Maximilian - Universität zu München

vorgelegt von
FRANZ HILTENSPERGER
Murnau

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Seitz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Mehnert
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.1.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	5
II.	Besprechung des vorliegenden Schrifttums	7
III.	Patientengut und Methodik	17
IV.	Ergebnisse	27
V.	Diskussion der Ergebnisse	37
VI.	Zusammenfassung	41
VII.	Literaturverzeichnis	43
VIII.	Lebenslauf	55

I. Einleitung

Bei jedem insulinspritzenden Diabetiker setzt innerhalb kurzer Zeit die Antikörperbildung in einem geringeren oder größeren Maße ein. Mit der Zunahme der diabetischen Stoffwechselerkrankungen erhöht sich auch die Zahl der Patienten, die eine relative oder echte Insulinresistenz aufweisen. Diese Fälle lassen sich meist schwer in eine gute Stoffwechsellage bringen und sind für die Praxis ein Problem geworden.

Im Laufe der Zeit sind verschiedene Möglichkeiten der Behandlung der Insulinresistenz angegeben worden. Ausgehend von dem Befund, daß Biguanide in der Kombination mit Insulin in der Lage sind, den täglichen Insulinbedarf unter gleichzeitiger Besserung der Stoffwechsellage zu senken, wurden auch orale Antidiabetika vom Typ der Biguanide in die Therapie der Insulinresistenz eingeführt (2).
Die Wirkungsweise der Biguanide blieb bisher ungeklärt. Unter anderem wurde diskutiert, daß die Besserung der Stoffwechsellage in einer Beeinflussung der immunologischen Vorgänge durch Biguanide zu suchen ist (5).

Neuere Untersuchungsmethoden ermöglichen den Einblick in die immunologischen Zusammenhänge der Insulinresistenz. Mit Hilfe dieser Methoden kann der freie Antikörper bei insulinspritzenden Patienten bestimmt werden. Falls Biguanide also über eine Beeinflussung der immunologischen Vorgänge wirken würden, sollte es möglich sein, dies mit immunologischen Methoden nachzuweisen.

Diese Frage wurde an Patienten geprüft, die einen täglichen Insulinbedarf von mehr als 48 Einheiten hatten. Es wurde dabei davon ausgegangen, daß an sich der tägliche Fremdinsulinbedarf eines Diabetikers jene Insulinmenge nicht überschreiten sollte, die ein intaktes Pankreas täg-

lich produziert. Unter dieser Voraussetzung sind also alle Diabetiker mit einem Tagesbedarf über 40 Einheiten Insulin als insulinunterempfindlich bzw. als insulinresistent anzusehen. Bei diesen Patienten wurden die Insulinbindungsverhältnisse mit und ohne Biguanidtherapie untersucht. Gleichzeitig wurden die Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel registriert.

II. Literaturübersicht

Definition und Häufigkeit der Insulinresistenz

Nach Martin und Mitarbeitern (1) spricht man von einer echten Insulinresistenz, wenn ein Patient an zwei aufeinander folgenden Tagen mindestens 200 Einheiten Insulin pro die benötigt. Dagegen liegt nach Ditschuneit und Federlin und anderen Autoren (2,3,4) eine Insulinresistenz immer dann vor, wenn die tägliche Insulindosis 40 Einheiten überschreitet - was etwa der Insulinsekretion eines gesunden Pankreas entspricht. Die Insulinresistenz nach Martin kommt in der Klinik selten vor. Das geht beispielsweise aus den Untersuchungen von Kraus (5) hervor. Sie fand, daß von 808 Patienten bei der Klinikaufnahme 112 Patienten mehr als 60 Einheiten pro die spritzten. Am Ende der stationären Behandlung ließ sich der tägliche Insulinbedarf bei 57 Patienten unter 60 Einheiten senken. Von den restlichen 55 Patienten benötigten nur sechs Diabetiker mehr als 80 Einheiten Insulin täglich und keiner über 100 Einheiten. Auch Daweke (7) berichtet, daß die Häufigkeit der chronischen Insulinresistenz etwa bei einem Prozent der Diabetiker liegt.

Die Therapie der Insulinresistenz

Gelegentlich bildet sich die Resistenz nur gegen das Insulin einer bestimmten Tierspezies, in diesen Fällen kann der Übergang zum Insulin einer anderen Tierart Erfolg zeigen (74). In anderen Fällen kann eine intravenöse Insulintherapie oder die Anwendung von Cortison-Derivaten bzw. immunsuppressiven Substanzen nützlich sein (7,8,10,11,12,13). Die kombinierte Insulin-Sulfonamidderivat-Behandlung wird

von den meisten Diabetologen abgelehnt. Zu erwägen wäre nach Mehnert (6) der Einsatz der neuen hochwirksamen Sulfonamidderivate (z.B. Glibenclamid) oft kombiniert mit Biguaniden unter Weglassung von Insulin.Die Umstellung auf orale Antidiabetika gelingt in einer nicht unbeträchtlichen Zahl (6).Natürlich handelt es sich in solchen Fällen um Diabetiker, bei denen das noch vorhandene körpereigene Insulin durch die Sulfonamidderivate nutzbar gemacht wird, sodaß auf Fremdinsulin verzichtet werden kann.
Hasselblatt und Schmieta (14) schließen aus ihren in vitro durchgeführten Versuchen,daß Tolbutamid auch antikörpergebundenes Insulin wieder freisetzt,jedoch wird dieses von anderen Autoren nicht bestätigt (73).
Der Versuch einer kombinierten Behandlung mit Insulin und Biguaniden ist immer dann angezeigt,wenn mit Insulin allein kein befriedigender Zustand erreicht werden kann(6). Mehnert (6) berichtet,daß nach seinen eigenen Erfahrungen bei etwa der Hälfte dieser schwierigen Fälle durch zusätzliche Biguanidgaben die Stoffwechselsituation deutlich verbessert werden konnte.Die Insulindosis kann mitunter erheblich gesenkt werden.Entscheidend für den Einsatz der Biguanide ist aber weniger die Senkung des täglichen Insulinbedarfs,als vielmehr die Stabilisierung der Stoffwechsellage.Die Schwankungen der Blutzuckerwerte nach oben und nach unten,sollen mit Biguaniden abgefangen (smoothing effect) und die Harnzuckerausscheidung soll verringert werden.Bei insulinbedürftigen,insulinresistenten Patienten sollte man immer den Versuch einer zusätzlichen Therapie mit Biguaniden machen (6).Klinische Erfahrungen sprechen dafür,daß orale Antidiabetika vom Typ der Biguanide in der Therapie der Insulinresistenz eine wichtige Rolle spielen können (5,6).Dies bezieht sich weniger auf jene außerordent-

lich seltenen Extremfälle, die mehrere hundert oder tausend Einheiten täglich benötigen, als vielmehr auf die häufigeren und für die Klinik und Praxis bedeutsamen Fälle, bei denen eine zwar überhöhte, aber nicht extrem hohe Insulindosis eine nur unzureichende Wirkung auf den Stoffwechsel ausübt (15). Eine mögliche Beziehung der Biguanide zum Immunmechanismus wurde bisher noch nicht untersucht (16).

Chemie und Toxizität der Biguanide

Biguanide gehören zur Gruppe der Guanidine. Bereits Watanabe (17) entdeckte 1918 den blutzuckersenkenden Effekt der Guanidine. Die Voraussetzung für eine blutzuckersenkende Wirkung der Biguanide ist der Guanidinrest, der nur an einem Stickstoffatom substituiert sein darf.

Man unterscheidet Mono-, Di- und Biguanide. Die wichtigsten Biguanide sind

1-(ß-Phenyläthyl) -biguanid (Phenformin),

1,1-Dimethylbiguanid (Metformin) und

1-Butylbiguanid (Buformin)

Die Toxizität wie auch der blutzuckersenkende Effekt zeigen nach Söling und anderen (18,19) bei den einzelnen Tierspezies große Unterschiede, so daß tierexperimentelle Ergebnisse nur mit Vorsicht auf den Menschen übertragen werden können.

Beim stoffwechselgesunden Menschen haben Guanidinderivate auf den Blutzucker keine Wirkung (20,21,22,23). Bei stoffwechselgesunden Meerschweinchen senken dagegen verschiedene Guanidinderivate den Blutzucker. Ratten und Kaninchen reagieren häufig mit einer Blutzuckererhöhung, der erst später ein Blutzuckerabfall folgt. Die Reaktion des Blutzuckerspiegels ist also sowohl von der Art der

Guanidinverbindung, als auch von der Dosis und der Tierspezies abhängig.

Auffallend ist, daß bei nahezu allen Tierspezies die Dosis, die den Blutzucker um 50 % senkt, nahezu identisch ist mit der Letaldosis. Lediglich Metformin macht dabei eine Ausnahme: der therapeutische Index dieser Verbindung liegt bei der Maus zwischen 5 und 10. Damit unterscheidet sich das Tier vom Menschen, der, wie Suizidversuche zeigten, mehr als das Zwanzigfache der therapeutischen Dosis zu tolerieren vermag (24).

Zur Theorie des Wirkungsmechanismus

Während das Insulin den Blutzucker sofort senkt, lassen die Guanidinderivate immer eine verzögerte Wirkung erkennen. Bei Diabetikern zeigte sich unter kurzfristiger Buforminbehandlung eine Toleranzverbesserung nach oraler Glukosebelastung. Eine anhaltende Besserung ließ sich jedoch nicht nachweisen (25).

Creutzfeldt (27) berichtet, daß bei Versuchen am Meerschweinchen mit hohen Biguaniddosen ein Laktatanstieg zu beobachten war. Im Bereich der toxischen Dosis ist dieser Laktatanstieg immer vorhanden, während er - eine normale Nierenfunktion vorausgesetzt - im therapeutischen Bereich nie vorkommt.

Am Menschen fanden mehrere Autoren andere Ergebnisse: Hirsch, Kaufmann und Wagner (26) vermißten nach Synthalin (=Diguanid), Tranquada et al. (28) nach Phenformin einen Anstieg der Serumlaktat-Konzentration. Craig et al. (29) beobachteten bei Phenformin, Söling et al. (18) sowohl unter Phenformin, als auch unter Butylbiguanidbehandlung in einzelnen Fällen einen deutlichen Anstieg der Laktatkonzentration im Serum von Diabetikern.

Neuere Untersuchungen an Diabetikern, die mit Butylbiguanid über mehrere Wochen behandelt wurden, ergaben auch bei mehrfacher Kontrolle keine signifikante Zunahme des Laktatspiegels bzw. des Laktat/Pyruvat -Quotienten im Blut (30). Staub und Jezler (31) hatten bereits bei ihren Versuchen mit Synthalin darauf hingewiesen, daß die am Tierversuch beobachtete, stark vermehrte, anaerobe Glykolyse beim synthalin-behandelten Diabetiker fehlte. Daher konnte die Blutzuckersenkung nicht durch eine Steigerung der anaeroben Glykolyse zustande gekommen sein. Dennoch wurde die Glykolysetheorie bei Einführung der Biguanide in die Diabetestherapie erneut zur Erklärung der blutzuckersenkenden Wirkung herangezogen. Diese Theorie ist aber mit den klinischen Erfahrungen nicht zu vereinbaren. Es besteht allerdings kein Zweifel, daß Guanidine (32) oder Biguanide (33,34,35) in geeigneten Konzentrationen den Elektronentransport über die Atmungskette blockieren können.

Die klinische Erfahrung hat jedoch gezeigt, daß eine Störung der Biguanidausscheidung von einer Zellatmungshemmung begleitet sein kann, nämlich dann, wenn der Biguanidspiegel im Plasma wesentlich über die sonst erzielten Konzentrationen ansteigt (36,37). Diese geringe Differenz zwischen therapeutischer und toxischer Dosis ist bei den meisten Tierversuchen unberücksichtigt geblieben.

Im Tierversuch, an Meerschweinchen und an Ratten, führten Guanidinderivate in blutzuckersenkender Dosis zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Verminderung des Leberglykogengehaltes. Dies gilt sowohl für Guanidin selbst, (17, 38,39) als auch für Synthalin (31,40,41) und verschiedene Biguanide (42,43,44,19,45,18).

Es ließ sich aber nicht abgrenzen, in wieweit es sich dabei um eine Folge zentral-adrenergischer Reizung oder

um Folgen einer durch Biguanide ausgelösten Hypoglykämie handelt. Williams et al. (46) schlossen auf eine Hemmung der Glukoneogenese durch Biguanide und fühlten ihre Meinung bestätigt durch Bilanzuntersuchungen, die eine verminderte Stickstoffausscheidung im Urin ergaben.

Beringer et al. (47) nahmen bei Diabetikern, die mit Phenformin behandelt wurden, Katheteruntersuchungen in der vena portae vor. Sie fanden dabei eine Verminderung der hepatischen Glukoseabgabe. Diese Verringerung ist jedoch, nach der Auffassung Beringers, nicht als eine Folge der Hemmung der Glukoneogenese anzusehen, da sie mit einer Leberglykogenzunahme verbunden ist.

Insgesamt ergeben sich grundlegende Unterschiede zwischen den Ergebnissen der klinischen sowie der in vitro mit therapeutischen Dosen durchgeführten Untersuchungen einerseits und den Resultaten der mit hohen Biguaniddosen vorgenommenen tierexperimentellen Untersuchungen andererseits. Experimente am Menschen erbringen keinen Nachweis für eine Hemmung der Zellatmung oder der oxydativen Phosphorylierung. Die an der isolierten Leber nachweisbare Verbesserung der Bilanzen von Aminosäuren und anorganischem Phosphat können sogar als Steigerung des oxydativen Stoffwechsels gedeutet werden (48).

Erstmals berichteten Williams et al. (46) über einen insulinähnlichen, die Glukoseaufnahme des inkubierten Rattenzwerchfells stimulierenden Effekt von Phenformin. Dieser Stimulationseffekt wurde später auch für andere Guanidinderivate von mehreren Autoren (49,50,51,52) bestätigt.

Phenformin steigert die Glukoseaufnahme des inkubierten Rattenzwerchfells im physiologischen Konzentrationsbereich. Dieser Effekt entspricht dabei etwa 500 µE/ml kristallisiertem Insulin (53). Im Gegensatz zu der Wirkung von Insulin, wird die unter Guanidineinwirkung vermehrt vom Gewebe aufgenommene Glukose aber nicht in Glykogen eingebaut, sondern zum überwiegenden Teil in Form

von Laktat an das Inkubationsmedium abgegeben (46,52,54). Neuere Untersuchungen, in vivo, an Ratten mit verschieden hohen Phenformin-Dosen haben keine insulinähnliche Förderung der Glykogensynthese gezeigt (55). Eine direkte Potenzierung der Wirkung von Insulin (56,57) oder eine Stimulierung eines bis heute hypothetischen Glukoseträgersystems in der Zellmembran (58,59) wird auf Grund der Befunde der zitierten Autoren diskutiert. Bei Untersuchungen der Permeabilität der Zellmembran für Glukose fanden Clarke und Forbath (60) ebenso wie Park et al. (61) unter Insulin einen Anstieg, unter Phenformin dagegen einen Abfall der freien intrazellulären Glukose. Williamson et al. (62) stellten an isolierten, schlagenden Rattenherzen fest, daß unter Insulin 25 % der vermehrt aufgenommenen Glukose in Glykogen und 14 % zu Laktat umgewandelt wurde, während bei Insulin- und Biguanidgabe, beinahe bei gleichbleibendem Glukosegesamtverbrauch, der in Laktat verwandelte Glukoseanteil auf 40 % anstieg.
Butterfield (63) untersuchte im Selbstversuch die Insulinempfindlichkeit des Unterarmgewebes. Er fand, daß nach sieben bis zehn Tagen oraler Phenformingabe die Insulinempfindlichkeit des Unterarmgewebes erhöht wurde.

Wie man aus den unterschiedlichen Ergebnissen sieht, ist bis heute noch kein sicherer Beweis erbracht worden, daß der blutzuckersenkende Biguanideffekt mit einer direkten Wirkung auf die Glukoseaufnahme durch die Muskulatur oder einer Steigerung des Insulineffekts auf die muskuläre Glukoseaufnahme erklärt werden kann.

Unter der Wirkung von Insulin wird die vermehrt von der Leber aufgenommene Glukose sowohl in Glykogen eingebaut, als auch über die Glykolyse und den Pentosephosphatzyklus abgebaut.

Zwischenprodukte werden zur Fettsynthese verwendet, ein

großer Teil wird vollständig zu Kohlendioxyd verbrannt. Unter der Einwirkung von Guanidinderivaten verändert sich jedoch das Schicksal der eingeschleußten Glukose. Der Einbau der Glukose in Glykogen fällt ab (64), woraus auf einen von Insulin verschiedenen Wirkungsmechanismus zu schließen ist. Die Verwertung der Glukose über die Stoffwechselkette im Fettgewebe wird durch Insulin besonders stark gefördert. Guanidinderivate lassen dagegen keine sichere Wirkung erkennen, wenn sie allein dem inkubierten epididymalen Fettgewebe zugesetzt werden (65,67).

Anders verhält es sich dagegen, wenn infolge der Einwirkung von Insulin vermehrt Glukose über den Pentosephosphatzyklus abgebaut wird. Dann entfalten die Guanidinderivate eine starke Hemmung. Dieser Hemmeffekt nimmt mit steigender Biguanidkonzentration zu (66). Der Hemmeffekt der Biguanide auf die durch Insulin gesteigerte Glukoseoxidation über den Pentosephosphat-Shunt wird bereits bei einer $2{,}1 \times 10^{-5}$molaren Phenformin-Konzentration von einer signifikanten Hemmung der Sauerstoffaufnahme des Rattennebenhoden-Fettgewebes begleitet (48,66).

Ditschuneit et al. (66) fanden, daß deutliche Effekte der Biguanide sich nur an dem durch Insulin gesteigerten Stoffwechsel der Fettzellen nachweisen lassen. Während die Lipogenese erheblich eingeschränkt wird, bleibt die Lipolyse durch Biguanide unbeeinflusst. Die als Ausdruck einer gesteigerten Lipolyse unter ACTH nachweisbare, vermehrte Abgabe von Fettsäuren und von Glyzerin, läßt sich durch das antilipolytisch wirksame Insulin weitgehend aufheben. Biguanide in Konzentrationen bis zu 10 µg/ml dagegen bleiben ohne jede antilipolytische Wirkung.

Creutzfeldt und Mönch (45) wiesen an normalen und alloxandiabetischen Ratten und an Meerschweinchen nach Gabe von Diguaniden (Synthalin) deutliche Degranulationen

und hydrophische Degeneration der A-Zellen und der Langerhansschen Inseln nach. Die Ursache dürfte eine unspezifische Zellschädigung sein, die man auch an der Leber und Niere fand. Dabei war kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Biguaniddosis, Blutzuckersenkung und Ausmaß der Zellschädigung zu finden. Dagegen konnten Creutzfeldt und Mönch (45) und Monike (67) nach Gabe von Synthalin in blutzuckersenkenden Dosen und Phenformin keine signifikante B-Zellen Degranulation bei Mäusen und Meerschweinchen feststellen. Am isolierten, durchströmten Hundepankreas konnte Mehnert (65) weder durch Phenformin, noch durch Butylbiguanid eine Erhöhung der Insulinsekretion erzielen. Untersuchungen von Falcone et al. (33) und von Schäfer (34) zur Lokalisation des Effekts blutzuckersenkender Guanidinderivate im intermediären Stoffwechsel ergaben, daß Biguanide die Atmung der Mitochondrien hemmen, ohne die Atmungskette zu entkoppeln.

Der Einbau von anorganischem Phosphat in ATP wird konzentrationsabhängig gehemmt, wobei diese Hemmung durch Phosphorylierung sowohl am ersten, als auch am zweiten Phosphorylierungsschritt erfolgen könnte. Offenbar staut sich eine energiereiche Zwischenstufe an, die infolge der Biguanidwirkung nicht weiter umgesetzt werden kann. Bei Biguanidkonzentrationen ab 6×10^{-5} M wird die Sauerstoffaufnahme isolierter Mitochondrien gedrosselt. Somit beruht der Laktatanstieg wahrscheinlich auf einer Hemmung des Elektronentransports über die Atmungskette. Es besteht nach Söling (48) kein Zweifel, daß die Biguanide in geeigneter Konzentration den Elektronentransport über die Atmungskette blockieren. Da solche Konzentrationen therapeutisch jedoch nicht erreicht werden, kann damit der blutzuckersenkende Effekt der Biguanide nicht erklärt werden.

Über welchen Mechanismus der blutzuckersenkende Effekt

der Biguanide letztlich zustande kommt, ist noch umstritten. Von Butterfield (63) wird auf Grund von Untersuchungen am isoliert durchströmten Unterarm des Menschen eine vermehrte periphere Glukoseutilisation postuliert, während Altschuld und Kruger (78) an der isoliert perfundierten Meerschweinchenleber eine Hemmung der Glukoseneubildung in der Leber annahm. Nach neuen Untersuchungen, insbesondere von Czyzyk (76) wird auch eine Hemmung der intestinalen Resorption verschiedener Nährstoffe unter dem Einfluß von Biguaniden diskutiert.

Wie oben erwähnt, wurden Biguanide neben den sonst üblichen Indikationen auch zur Behandlung therapieresistenter Patienten eingesetzt. So berichtet Kraus (5) über sechs Fälle, die für einige Wochen mit Biguaniden behandelt wurden. Dabei wurde der Insulinbedarf in fünf Fällen teilweise drastisch gesenkt. Als Zeichen der Stoffwechselstabilisierung nahmen die täglichen Harnzuckerausscheidungen stark ab, die Blutzuckerwerte sanken bei fünf Patienten deutlich ab, während in einem Fall eine leichte Erhöhung festgestellt wurde. Auch Ditschuneit und Federlin (2) bestätigten, daß die Insulinunterempfindlichkeit mit Biguaniden verbessert werden kann.

Für unsere Untersuchungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

1) Liegt bei Diabetikern mit einem erhöhten Insulinbedarf, der auf Biguanidgabe gesenkt werden kann, in jedem Fall eine immunologische Insulinresistenz vor?
2) Geht die Senkung des Insulinbedarfs womöglich mit einer Beeinflussung der immunologisch meßbaren maximalen Bindungskapazität für Insulin einher?
3) Werden in allen Fällen die Stoffwechselparameter unter Biguanidtherapie gebessert?

III. Patientengut und Methodik

Das Krankengut bestand aus diabetischen Patienten der III. Medizinischen Abteilung des Schwabinger Krankenhauses, die zum größten Teil ambulant behandelt wurden. Der tägliche Insulinbedarf lag bei allen Patienten über 48 Einheiten, was nach dem oben Gesagten auf eine Insulinunterempfindlichkeit schließen läßt (2,3,4).
Untersucht wurden insgesamt 37 Patienten. Der tägliche Insulinbedarf betrug 48 bis 170 Einheiten pro die. Die Patienten wurden in folgende Gruppen unterteilt:

a) Bei fünf Patienten, die jahrelang unter einer Buformin-Therapie standen, wurde dieses Biguanidpräparat 14 Tage bis drei Wochen lang abgesetzt. Nach dieser Auslaßperiode erhielten die Patienten erneut sechs Wochen lang Buformin. Die maximale Insulinbindungskapazität wurde vor und nach dem Absetzen und etwa sechs Wochen nach Wiederaufnahme der Biguanidtherapie bestimmt.
b) Bei fünf Patienten, die noch nie Biguanide erhalten haben, wurde die maximale Insulinbindungskapazität unter stationären Verhältnissen bestimmt. Nach vierwöchiger Biguanid-Therapie wurde ambulant eine Kontrolle der Bindungsverhältnisse vorgenommen.
c) Als Kontrollgruppe zu b) wurde die maximale Insulinbindungskapazität bei vier Patienten stationär, ohne Biguanide und nach einem vierwöchentlichen Abstand ambulant, wieder ohne Biguanid-Therapie bestimmt.
d) An zehn ambulante Patienten, bisher ohne Biguanidbehandlung, wurden Biguanide verabreicht. Die maximale Insulinbindungskapazität wurde vor und nach der Biguanid-Therapie bestimmt.
e) Zur Beurteilung von Spontanschwankungen der maximalen Insulinbindungskapazität wurden an sechs ambulanten

bzw. sieben stationären Patienten mit konstantem Insulinbedarf und ohne Biguanid-Therapie Kontrollmessungen der Insulinbindungskapazität während drei Monaten bzw. vier Wochen durchgeführt. Als Qualitätskontrolle diente die mehrfache Bestimmung von zehn verschiedenen Seren.

Methode

Um für alle Seren konstante Bedingungen zu schaffen, haben wir die Blutentnahmen in konstantem Abstand zur Insulininjektion, in der Regel zwei bis drei Stunden danach, durchgeführt. Das Serum wurde eine halbe Stunde nach der Blutentnahme abzentrifugiert und bis zur Bestimmung bei -20°C tiefgefroren. Nach Untersuchungen von Kerp und Mitarbeitern (72) bleibt bei Aufbewahrung von tiefgefrorenen Seren die Insulinbindungskapazität während eines halben Jahres konstant.

Reagenzien:

125-J-markiertes Rinderinsulin (Novo-Industrie).
Die spezifische Aktivität lag zwischen 6,3 und 11,5 mc/mg.
Phosphatpuffer 0,04 molar, pH 8,0
a) 5,444 g/l KH_2PO_4
b) 14,314 g/l $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$
55 Teile a) und 945 Teile b)
Rinderalbumin trocken "reinst" Behringwerke
Jodacetamid reinst (Serva, Heidelberg), umkristallisiert durch dreimaliges Erwärmen und Abkühlen in destilliertem Wasser mit zwischenzeitlichem Wasserwechsel.
Hochgereinigtes, 10mal umkristallisiertes Rinderinsulin (Novo-Industrie)
Zellulosepulver MN 100 (Macherey & Nagel, Düren)
Sephadex G 50 fine
Bromphenolblau "Merck"

Das markierte Insulin wurde 24 Stunden vor Gebrauch von unspezifischer Radioaktivität gereinigt.
Zu 1,0 ml Normalserum und 0,2 ml einer einprozentigen Bromphenolblaulösung wurden 0,2 ml (= 20 mc) der verdünnten Radioinsulinstammlösung gegeben. Die Stammlösung war mit dem Phosphatpuffer, enthaltend 0,25% Rinderalbumin und 10 mg% Jodacetamid auf 10 ml aufgefüllt. Der Albuminzusatz verhindert die Adsorption des Insulins an Glas (68). Das Jodacetamid schützt vor mikrobakteriellen Verunreinigungen.

Der größte Teil des nicht an intakte Insulinmoleküle gebundenen radioaktiven Jods lagert sich rasch an die Serumproteine an und läßt sich so als unspezifische Radioaktivität durch Gelfiltration abtrennen.

Das Gemisch wurde auf eine 50 ml fassende Säule, 27 cm hoch, mit geringem Totvolumen (Pharmacia Upsala, Schweden) gegeben, die 6,0 g Sephadex in Phosphatpuffer enthielt. Je fünfzehn Tropfen wurden in mindestens 40 Reagenzgläsern aufgefangen, die Messung der Radioaktivität erfolgte im Autogammaspectrometer von Packard. Die Radioaktivitäts-Verteilungskurve zeigt drei deutlich von einander abgesetzte Gipfel (69). Die maximale Radioaktivität des hohen mittleren Gipfels wurde zusammengefaßt und für die Versuche verwendet. Diese Fraktion charakterisiert sich durch ihr immunologisches Verhalten und durch ihre biologische Wirksamkeit als Insulin (69,70).
Das nicht markierte, zehn mal umkristallisierte Rinderinsulin (40 µg = 1 Einheit) wurde in n/300 Salzsäure gelöst und zunächst mit dem oben genannten Phosphat-Albumin-Jodacetamidpuffer auf die Verdünnung von 10^6 µE/ml gebracht. Aus dieser Stammlösung wurden die weiteren Verdünnungen hergestellt.

Die Bestimmungsansätze wurden in dem gleichen Puffer achtfach vorbereitet, nämlich in Anwesenheit von

10^3, $5x10^3$, $7,5x10^3$, 10^4, $3x10^4$, $5x10^4$, $7,5x10^4$, 10^5 µE/ml.

Es wurden immer Doppelwerte gemessen, um den methodischen Fehler möglichst klein zu halten.
Nur wenn sich eine sehr hohe Insulinbindungskapazität des Patientenserums ergab, wurde die Untersuchung mit

$5x10^5$, $7,5x10^5$, 10^6 µE/ml

nicht markierten Insulins pro Ansatz erweitert. Die pro Ansatz zugegebene Radiojodinsulin- Tracerdosis lag bei 10 nc, entsprechend 10 000 Impulsen pro Minute bei einem Wirkungsgrad des Zählgerätes von ca. 40%.
Der Einzelansatz besteht aus 1,8 ml Phosphat-Albumin-Jodacetamidpuffer, enthaltend das markierte und das unmarkierte Insulin. Dazu wurden 0,2 ml Patientenserum gegeben, das nun bei dem Gesamtvolumen des Ansatzes von 2,0 ml auf 1:10 verdünnt ist. Nach Umschütteln inkubierte das Gemisch 48 Stunden bei vier Grad Celsius. Erst nach dieser Zeit ist die maximale Bindung des zugesetzten Insulins eingetreten. Dann wurden nach Radioaktivitätsmessung 200 mg Zellulosepulver zugegeben und die Ansatzröhrchen 5 Minuten in einer Schüttelapparatur geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der festen Phase wurde die Radioaktivität von 1,0 ml abpippettiertem Überstand gemessen.

Das Zellulosepulver diente zur Abtrennung des freien vom antikörpergebundenen Insulin.

Sowohl von der halbierten Gesamtimpulszahl, als auch von der des Überstandes ist der Blindwert (Leerwert des Gerätes und Aktivität eines Kontrollansatzes ohne Jodinsulin) abzuziehen (69).

Die Menge des an antikörpergebundenen Insulins ergibt sich aus dem Verhältnis des halbierten Zählwerts der Gesamtaktivität zur Zählausbeute des Überstands.
Diese Methode wurde zum größten Teil von Kühnau (69) übernommen.

Mathematische Auswertung der erhaltenen Meßpunkte

Zuerst wurde versucht aus den Meßergebnissen und den von Berson und Yalow (71) für die Insulinantikörperbestimmung eingeführten Koordinatensystem nach Scatchard (75) die maximale Insulinbindungskapazität graphisch zu ermitteln. Es zeigte sich jedoch, daß bei dieser Methode die Fehlerbreite bis zu 50% der Gesamtbindungskapazität betrug. Deshalb wurde nach einem einfachen mathematischen Verfahren gesucht, um die maximale Insulinbindungskapazität im Rahmen der Meßgenauigkeit mit kleinst möglichen Fehler zu ermitteln.
Als Grundlage für die mathematische Bestimmung diente das Massenwirkungsgesetz, das der Reaktion von Insulin und Insulinantikörper zu Grunde liegt (71).
Es wurde ein lineares Gleichungssystem aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet, damit die maximale Insulinbindungskapazität auch mit einfachen Mitteln und dennoch kleinst möglichen Fehler bestimmt werden kann.

$$1 \quad K = \frac{[Ag\,Ak]}{[Ag][Ak]}$$

wobei AgAk die Konzentration des Antigen-Antikörperkomplexes, Ag die Konzentration des freien Antigens und Ak die Konzentration der freien Insulinbindungsstellen des Antikörpers bedeuten. Außerdem gilt:

$$2 \quad [Ak_{ges}] = [Ak] + [Ag\,Ak]$$

da Ak_{ges} die molare Konzentration aller vorhandenen Insulinbindungsstellen bezeichnet.
Bei Einsetzen von Gleichung (2) in Gleichung (1) folgt daraus:

$$3 \quad K = \frac{[Ag\,Ak]}{[Ag]\,([Ak]-[Ag\,Ak])}$$

Aufgelöst nach AgAk erhält man:

$$4 \quad AgAk = \frac{K \cdot Ak \cdot J}{1 + K \cdot J} = \frac{Ak \cdot J}{\frac{1}{K} \cdot J} \qquad (K \neq 0!)$$

Für den Fall, daß mehrere Bindungsstellen vorliegen (75) gilt:

$$5 \quad AgAk = AgAk_1 + \ldots\ldots + AgAk_e = \frac{Ak_1 \cdot J}{\frac{1}{K_1} + J} + \ldots\ldots + \frac{Ak_e \cdot J}{\frac{1}{K_e} + J}$$

Setzt man die allgemein üblichen Bezeichnungen für antikörpergebundenes Insulin = B und für freies Insulin = F ein, so kann man die Gleichung (5) umändern in:

$$6 \quad \frac{B}{F} = \frac{Ak_1}{\frac{1}{K_1} + F} + \ldots\ldots + \frac{Ak_e}{\frac{1}{K_e} + F}$$

Setzt man y = B/F und x = F, so folgt:

$$7 \quad y(x) = \frac{Ak_1}{\frac{1}{K_1} + x} + \ldots\ldots + \frac{Ak_e}{\frac{1}{K_e} + x}$$

Die gemessenen n Wertepaare (x_i, y_i) (i = 1 ---- n) hat man mit der Funktion aus Gleichung (7) möglichst genau zu bestimmen, d.h. man versucht nach der Methode der kleinsten Quadrate mit einer Geraden auszugleichen.
Man bestimmt die Parameter in Gleichung (7) derart, daß die Summe minimal wird:

$$8 \quad Z = \sum_{i=1}^{n} \left(1 - \frac{y(x_i)}{y_i}\right)^2$$

Z aus Gleichung (8) ist eine Funktion der Parameter Ak_1 bis Ak_n und $1/K_1$ bis $1/K_n$. Aus der notwendigen Bedingung für ein Minimum folgt die partielle Ableitung:

$$9 \quad \frac{\partial Z}{\partial Ak_1} = 0, \ldots, \frac{\partial Z}{\partial Ak_e} = 0, \quad \frac{\partial Z}{\partial K_1} = 0, \ldots, \frac{\partial Z}{\partial K_e} = 0$$

Es stellt sich jetzt die Frage, wieviele Hyperbeln man in Gleichung (7) berücksichtigen muß. Die Antwort wird außer durch die chemische Theorie auch durch die Genauigkeit der Meßwerte bestimmt. (Der relative Meßfehler liegt bei etwa 10%). Ändert sich beim Übergang von n Summanden zu (n + 1) der Wert des Minimums in Gleichung (8) nicht mehr, so muß man sich mit n Summanden zufrieden geben. Mit n = 1 beginnend, kann man durch schrittweises Erhöhen von n um 1 den maximalen Wert von n bestimmen.

Bei der Funktion in Gleichung (7) kann noch folgende Schwierigkeit auftreten: sind die gesuchten Werte von Ak_i und $1/K_i$ (i = 1 .... n) in einem Hyperbelsummand um einige Zehnerpotenzen größer als die auftretenden x_i - Werte, so kann man Zähler und Nenner mit der gleichen Zahl multiplizieren, also Ak_i und $1/K_i$ erheblich ändern, ohne daß sich der Wert des Bruches wesentlich ändert. Diese numerische Instabilität kann man durch Erweiterung jedes Hyperbelsummanden mit seinem reziproken Zähler beheben. Man erhält somit aus Gleichung (7):

$$y(x) = \frac{1}{\frac{1}{K_1 \cdot Ak_1} + \frac{x}{Ak_1}} + \ldots + \frac{1}{\frac{1}{K_e \cdot Ak_e} + \frac{x}{Ak_e}}$$

Zur Abkürzung führt man die neuen Parameter ein:
$a_i = 1/Ak_1$ und $c_i = 1/K_i\, Ak_i$ ein und erhält:

$$10 \quad y(x) = \frac{1}{a_1 x + c_1} + \ldots + \frac{1}{a_e x + c_e}$$

Mit dieser Funktion gleicht man nun nach Gleichung (8) und (9)

aus. Die Größe Z ist die Bezeichnung für den relativen Zwang, aus der sich der mittlere Fehler $(1 - y(x_i)/y_i)^2$ (relative Streuung) zu $\sqrt{\frac{Z}{n}}$ berechnet. Die Fehlerquadratsumme unter Zwang beträgt:

$$\sum_{i=1}^{n} \left(y_i - y(x_i)\right)^2$$

Für den Fall n = 1:

Der Fall n = 1 läßt sich noch über ein lineares Gleichungssystem lösen. Die Gleichung (10) hat die Form:

$$11 \quad y(x) = \frac{1}{a_1 x + c_1}$$

Man geht zur reziproken Funktion u(x) = 1/y(x) über, also

$$12 \quad u(x) = ax + c \qquad (a = a_1 \,/\, c = c_1)$$

und benutzt Gleichung (8) und (9) ($u_i = 1/y_i$, i = 1 .... n):

$$13 \quad Z' = \sum_{i=1}^{n} \left(1 - \frac{ax_i + c}{v_i}\right)^2 = \text{minimal}$$

$$0 = \frac{\partial Z'}{\partial c} = \sum_{i=1}^{n} -2\left(1 - \frac{ax_i + c}{v_i}\right)\frac{1}{v_i} \quad / \quad 0 = \frac{\partial Z'}{\partial a} = \sum_{i=1}^{n} -2\left(1 - \frac{ax_i + c}{v_i}\right)\frac{x_i}{v_i}$$

Daraus folgt

$$a\sum_i \frac{x_i}{v_i^2} + c\sum_i \frac{1}{v_i^2} = \sum_i \frac{1}{v_i}$$

$$a\sum_i \left(\frac{x_i}{v_i}\right)^2 + c\sum_i \frac{x_i}{v_i^2} = \sum_i \frac{x_i}{v_i}$$

Oder mit $u_i = 1/y_i$:

$$14 \quad \begin{cases} a\sum_i x_i y_i^2 + c\sum_i y_i^2 = \sum_i y_i \\ a\sum_i x_i^2 y_i^2 + c\sum_i x_i y_i^2 = \sum x_i y_i \end{cases}$$

Die Gleichung (14) stellt ein lineares Gleichungssystem zur Berechnung von a und c dar:

$$a = \frac{(\sum x_i y_i^2)\cdot(\sum y_i) - (\sum y_i^2)(\sum x_i y_i)}{(\sum x_i y_i^2)^2 - (\sum y_i^2)(\sum x_i^2 y_i^2)} \qquad \left(Ak_1 = Ak_{ges} = \frac{1}{a}\right)$$

$$c = \frac{\sum y_i x_i - a \sum x_i^2 y_i^2}{\sum x_i y_i^2}$$

Sind a und c größer Null, so hat man eine Lösung gefunden.

Für den Fall n = 2:

In diesem Fall kann man sich noch über ein lineares Gleichungssystem einen guten Startwert für eine Iteration zur Lösung des Ausgleichsproblems der Gleichungen (7),(8) und (9) verschaffen. Dazu braucht man die Funktion in der Form der Gleichung (7). Mit den Abkürzungen
$a = Ak_1$, $b = Ak_2$, $c = 1/K_1$ und $d = 1/K_2$ wird:

15 $$y(x) \approx \frac{a}{x+c} + \frac{b}{x+d}$$

Man multipliziert die Gleichung (15) mit (x+c) (x+d) und erhält: $y(c+x)(d+x) = a(x+d) + b(x+c)$

oder $$0 = (a+b)x^2 - (c+d)xy + (ad+bc)\cdot x - cdy - yx^2$$

Mit $(a+b) = p_1$, $(c+d) = p_2$, $(ad+bc) = p_3$, $cd = p_4$ und
$f_1(x,y) = x^2$, $f_2(x,y) = -xy$, $f_3(x,y) = x$, $f_4(x,y) = -y$,
$f_5(x,y) = -yx^2$
wird daraus

16 $$\sum_{k=1}^{4} \left(p_k f_k(x,y)\right) - f_5(x,y) = 0$$

Nun sollten alle Meßwerte (x_i, y_i) diese Gleichung bei geeigneter Wahl der p_K erfüllen. Für eine Wahl der p_K wird das aber nur bis auf einen Rest r_i möglich sein:

17 $$\sum_{k=1}^{4} \left(p_k f_k(x_i, y_i)\right) - f_5(x_i, y_i) = r_i \qquad (n > 4)$$

Man wird also die p_K so wählen, daß die Reste r_i möglichst klein

werden, d.h. etwa die Restequadratsumme minimal wird:

$$18 \quad R = \sum_{i=1}^{n} r_i^2 = \text{minimal}$$

nun ist $R = \sum_i r_i^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\sum_{k=1}^{4} p_k f_k(x_i, y_i) - f_5(x_i, y_i) \right)^2 = \text{minimal}$

Man differenziert wieder partiell nach p_K:

$$\frac{\partial R}{\partial p_j} = \sum_{i=1}^{n} \left[2 \left(\sum_{k=1}^{4} p_k f_k(x_i, y_i) - f_5(x_i, y_i) \right) f_j(x_i, y_i) \right] = 0 \qquad (j = 1, \ldots, 4)$$

oder

$$19 \quad \sum_{k=1}^{4} p_k \left(\sum_{i=1}^{n} f_k(x_i, y_i)\, f_j(x_i, y_i) \right) = \sum_{i=1}^{n} f_5(x_i, y_i)\, f_j(x_i, y_i)$$

Bezeichnet man mit

$$20 \quad a_{jk} = \sum_{i=1}^{n} f_j(x_i, y_i)\, f_k(x_i, y_i) \text{ mit } jk = 1, \ldots, 4 \text{ und}$$
$$b_j = \sum_{i=1}^{n} f_5(x_i, y_i)\, f_j(x_i, y_i) \text{ mit } j = 1, \ldots, 4$$

so erhält man das lineare Gleichungssystem zur Berechnung der p_K:

$$21 \quad \sum_{k=1}^{4} a_{jk}\, p_k = b_j$$

oder

$$\begin{aligned} a_{11}\, p_1 + a_{12} p_2 + a_{13} p_3 + a_{14} p_4 &= b_1 \\ \vdots \qquad\qquad \vdots \qquad\qquad \vdots \qquad\qquad \vdots \qquad &\vdots \\ a_{41}\, p_1 + a_{42} p_2 + a_{43} p_3 + a_{44} p_4 &= b_4 \end{aligned}$$

Dieses Gleichungssystem muß man nun lösen (Gauß-Eliminationsverfahren) und falls alle p_1 bis p_4 größer Null sind, hat man eine Lösung gefunden.

Nach diesem Verfahren hat sich gezeigt, daß die vorliegenden Meßwerte für Ak_1 Werte lieferten, die 1 bis 10% des Wertes von Ak_2 betrugen.

Die vorhandenen Meßwerte wurden bereits durch eine Hyperbel (n = 1) bestmöglich ausgeglichen, d.h. es konnte nur ein Ak_{ges} zuverlässig bestimmt werden.

IV. Ergebnisse

1. Erklärung der Abkürzungen in den Tabellen:

Pat.:	Patient
Alt.:	Alter des Patienten in Jahren
I.B.:	Insulinbedarf der Patienten pro die in Einheiten
I.Th.:	Dauer der Insulintherapie in Jahren
1.U.:	Höhe der maximalen Insulinbindungskapazität bei der 1. Untersuchung in E/Liter
2.U.:	Höhe der maximalen Insulinbindungskapazität bei der 2. Untersuchung in E/Liter
3.U.:	Höhe der maximalen Insulinbindungskapazität bei der 3. Untersuchung in E/Liter
4.U.:	Höhe der maximalen Insulinbindungskapazität bei der 4. Untersuchung in E/Liter
HZ:	Harnzuckerausscheidung in g
BZ:	Blutzuckerwert in mg%
amb.:	ambulante Patienten
stat.:	stationäre Patienten

Die Ergebnisse sind aus den Tabellen I bis VI ersichtlich. In Tabelle I ist das Verhalten des Antikörper - Titers vor Absetzen und nach Wiederaufnahme der Therapie mit Buformin aufgeführt.
Fünf Patienten bekamen mindestens ein Jahr lang 200 bis 400 mg Buformin täglich, dieses wurde 14 Tage bis drei Wochen lang abgesetzt, dann erhielten die Patienten sechs Wochen lang wieder Buformin. Die maximale Insulinbindungskapazität wurde vor und nach dem Absetzen des Buformins bestimmt.
Wie aus der Tabelle I zu entnehmen ist, steigt nach Absetzen des Buformins die maximale Insulinbindungskapazität aller Patientenseren an. Nach Wiedereinsetzen der Biguanidtherapie steigt die Bindungskapazität in zwei Fällen weiter an, in drei Fällen fällt sie wieder ab.

Die Blutzuckerwerte und die Harnzuckerausscheidung steigen in allen Fällen nach Absetzen des Buformins an. Bei Wiederaufnahme der Biguanidtherapie fallen bei der ersten Messung die Blutzuckerwerte und die Harnzuckerausscheidung in vier Fällen wieder ab nur in einem Fall ist eine weitere Zunahme zu beobachten.

Das Cholesterin und die Gesamtlipide wurden ebenfalls zum Zeitpunkt der Antikörperbestimmung registriert. Dabei konnten bei vier Patienten keine Schwankungen der normalen Cholesterin- und Gesamtlipidwerte gefunden werden, während es bei dem Patienten 4 (V.R.) zu einem Anstieg der vorher normalen Cholesterin-und Gesamtlipidwerte nach Absetzen der Biguanidtherapie kam (der Cholesterinspiegel stieg von 258 auf 323 mg% und die Gesamtlipide erhöhten sich von 1005 auf 1820 mg%).

Tabelle 1:

Pat.	Alt.	I.B.	I.Th.	I.U.	HZ	BZ	II.U.	HZ	BZ	III.U.	HZ	BZ	IV.U.	HZ	BZ
M.G.	66	56	9	94,64	2,3	145	162,61	18,0	225	219,81	11,2	166			
I.O.	33	52	9	17,51	6,2	116	68,07	34,0	234	36,29	87,0	274	91,31	12,4	126
H.A.	17	52	5	3,50	85,5	108	11,76	108,0	340				0,00	36,4	227
V.R.	65	68	3	13,37	22,0	215	25,62	30,0	230	36,14	0,0	174	125,74	2,4	366
F.W.	79	56	11	6,93	36,0	161	37,62	30,3	226	21,91	8,4	175	16,37	37,0	312

Tabelle 1: Insulinbindungskapazitäten und Verlauf von Blut- und Harnzuckerwerten bei fünf Patienten unter Biguanid-Therapie. Die erste Untersuchung (I.U.) erfolgte vor Absetzen der Biguanide, die zweite Untersuchung (II.U.) erfolgte zwei bis drei Wochen nach Unterbrechung der Biguanidbehandlung. Die dritte (III.U.) und die vierte (IV.U.) Untersuchung wurde sechs bzw. zehn Wochen nach Wiederaufnahme der Biguanid-Therapie vorgenommen.

In Tabelle II wurde bei fünf Patienten, die noch nie Biguanide erhalten hatten, die maximale Insulinbindungskapazität unter stationären Verhältnissen bestimmt. Nach vierwöchentlicher Biguanidtherapie wurde eine ambulante Kontrolle der Bindungsverhältnisse vorgenommen. Man sieht, daß die maximale Bindungskapazität in vier Fällen trotz Buformintherapie ansteigt, nur in einem Fall fällt sie ab.

Pat.	Alt.	I.B.	I.Th.	I.U.	II.U.
T.M.	50	40	2	64,84	112,21
H.Z.	28	52	4	19,38	43,00
J.F.	61	24	1	22,55	43,29
G.G.	25	48	4	35,09	133,30
W.B.	70	44	2	106,79	43,59

Tabelle II:
Insulinbindungskapazitäten bei fünf stationären Patienten, die noch nie Biguanide erhalten hatten (I.U.), ambulante Kontrolle nach vierwöchentlicher Biguanidtherapie (II.U.).

Die Patienten der Tabelle III stellen eine Kontrollgruppe zu Tabelle II dar. Die maximale Insulinbindungskapazität wurde bei vier Patienten stationär, ohne Biguanide und nach einem vierwöchigen Abstand ambulant,wieder ohne Biguanide bestimmt. Es ist dieser Tabelle zu entnehmen, daß die maximale Bindungskapazität in drei Fällen nach Entlassung ansteigt, während sie in einem Fall gering abfällt.

Pat.	Alt.	I.B.	I.Th.	I.U.	II.U.
W.M.	41	32	1	23,85	27,75
J.U.	25	60	18	75,44	272,00
G.M.	41	48	2	43,15	61,70
J.D.	56	44	9	36,27	32,09

Tabelle III:
Insulinbindungskapazitäten bei vier stationären Patienten ohne Biguanidtherapie (I.U.), ambulante Kontrolle - ebenfalls ohne Biguanide - nach vierwöchigem Abstand (II.U.).

In Tabelle IV wurde bei zehn ambulanten Patienten, die bisher ohne Biguanidbehandlung waren, die maximale Insulinbindungskapazität bestimmt. Diesen Patienten wurde dann Buformin verabreicht und in vierwöchentlichem Abstand die Bindungskapazität gemessen.
Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß in dieser Gruppe der freie Antikörper vor und nach Biguanidtherpie starken Schwankungen unterliegt. Dabei läßt sich eine eindeutige Tendenz nicht ablesen. In vier Fällen ist die Insulinbindungskapazität nach acht Wochen angestiegen, in einem Fall abgefallen und in zwei anderen Fällen unverändert geblieben. In drei Fällen war eine steigende Tendenz der Bindungskapazität bereits nach vier Wochen abzulesen, desgleichen zeichnete sich auch im Falle der Senkung der Bindungskapazität eine abfallende Tendenz nach vier Wochen weiter ab. In den übrigen Fällen ist eine eindeutige Tendenz nicht zu erkennen. Aus dem Verlauf der Blutzuckerwerte und der Harnzuckerausscheidung läßt sich keine Korrelation zu dem Verlauf der Bindungskapazität herstellen.

Tabelle IV:

Pat.	Alt	I.D.	I.Th.	I.U.	HZ	BZ	II.U.	HZ	BZ	III.U.	HZ	BZ
W.B.	70	44	2	75,13	43,6	276	24,64	30,6	217	43,59	3,4	193
G.G.	25	48	4	35,09	2,3	127	67,21	8,7	115	139,3		
G.P.	50	52	22	20,41	56,0	272	45,0	11,8	165			
F.H.	43	52	4	23,81	28,0	112	32,38	80,0	195			
M.K.	64	52	22	8,93	12,0	140	22,11	2,1	134	26,34	18,0	80
O.G.	73	52	4	25,05	1,5	200	40,7	20,4	210			
K.D.	27	52	4	37,13	36,0	180	12,67	6,7	146	37,98	26,0	140
A.R.	20	56	2	142,43	6,0	74	126,48	34,0	130	154,44	53,0	275
A.G.	29	60	3	72,21	0,0	154	175,58	2,5	300	142,69	0,6	275
W.P.	50	68	5	30,35		234	28,73		184	76,09		257

Insulinbindungskapazitäten und Verlauf von Blut- und Harnzucker-Werten bei 10 ambulanten Patienten, die noch nie Biguanide erhalten hatten (I.U.),ambulante Kontrolle nach vierwöchentlicher (II.U.)bzw. achtwöchentlicher (III.U.) Biguanid-Therapie .

Zur Beurteilung von Spontanschwankungen der maximalen Insulinbindungskapazität (Tabelle V) wurden an sechs ambulanten (Tabelle V,a) bzw. sieben stationären (Tabelle V,b) Patienten mit konstantem Insulinbedarf und ohne Biguanid-Therapie Kontrollmessungen der Insulinbindungskapazität während drei Monaten bzw. vier Wochen durchgeführt.
Bei sechs ambulanten Patienten war ein deutlicher Anstieg der Bindungskapazität zu verzeichnen, die sich teilweise nach vier Wochen abzeichnete. Bei den stationären Patienten kam es in drei Fällen zu einem deutlichen Anstieg der Bindungskapazität - nach vier Wochen - , während auch in drei weiteren Fällen ein deutlicher Abfall der Bindungskapazität nachweisbar ist. In einem Fall bleibt die Bindungskapazität gleich . Auch in diesen beiden Gruppen läßt sich keine Korrelation zwischen Änderung der Bindungskapazität und den Schwankungen der Blutzuckerwerte und der Harnzuckerausscheidung ablesen.

Tabelle V a):

Insulinbindungskapazitäten bei 6 ambulanten (V a) und 7 stationären (V b) Patienten ohne Biguanid-Therapie, Kontrolle unter gleichbleibenden Bedingungen in vierwöchentlichen Abständen.

Pat.	Alt.	I.B.	I.Th.	I.U.	HZ	BZ	II.U.	HZ	BZ	III.U.	HZ	BZ
P.B.	64	60	8	45,32	42,5	384	46,21	35,0	256	77,27	68,0	217
J.E.	38	60	11	182,08	6,0	154	145,52	57,6	188	352,85	0,0	223
A.F.	20	56	2	90,74	16,0	196				142,43	6,0	74
J.H.	56	48	10	0,00	30,0	240				14,2	60,0	100
M.K.	64	52	22	4,29	1,4	200	8,93	0,0	140			
K.M.	40	40	2	49,89						165,28		
Tabelle V b)												
J.Z.	31	40	12	42,27	0,0	218	11,84	0,0	120			
G.R.	40	56	5	60,39	27,0	230	133,36	38,0	256			
C.H.	28	16	4	16,6	0,0	170	56,72	2,0	150			
K.H.	42	44	3	58,51	14,2	252	88,35	3,0	120			
J.F.	20	60	12	75,43	31,2	408	45,93	0,0	165			
K.O.	48	24	4	14,70	50,0	380	14,25	7,0	205			
P.K.	16	60	3	158,32		284	27,29		126			

Als Qualitätskontrolle in Tabelle VI diente die mehrfache Bestimmung von zehn verschiedenen Diabetikerseren an verschiedenen Tagen.

Pat.	I.U.	II.U.
H.G.	175,58	151,69
M.G.	219,81	188,74
O.I.	91,31	106,99
M.K.	26,34	23,77
C.H.	19,98	18,85
G.W.	4,35	9,12
I.S.	23,66	24,82
K.D.	53,58	36,88
F.J.	15,10	14,70
M.Z.	11,87	10,93

Der mittlere Fehler beträgt in diesen Fällen 12,3 %.

V. Diskussion der Ergebnisse

Ziel der Untersuchungen war es zu klären, ob die Behandlung von insulinresistenten Patienten mit Biguaniden zu einer Beeinflussung der immunologisch nachweisbaren Insulinbindungskapazität dieser Patienten führt. Methodisch wurde dabei so vorgegangen, daß bei längerer Zeit unter Biguanid-Therapie stehenden Patienten diese Medikamente über einen gewissen Zeitraum abgesetzt und dann wieder verordnet wurden, während bei einer anderen Patientengruppe, die noch nie Biguanide erhalten hatte, diese Medikamente nach Bestimmung der maximalen Insulinbindungskapazität eingesetzt wurden und der Verlauf der Insulinbindungskapazität kontrolliert wurde. Als Kontrolle diente eine etwa gleich große Patientengruppe, bei der ohne Änderung der Therapie, insbesondere ohne Biguanide, die maximale Insulinbindungskapazität in entsprechenden Abständen bestimmt wurde.
Die Interpretation der Ergebnisse, die in den Tabellen I bis V dargestellt wurden, ist schwierig. Bei keiner der aufgeführten Gruppen läßt sich eine eindeutige Tendenz ablesen. Es kommt weder bei Patienten, bei denen nach Langzeit-Biguanid-Therapie die Medikamente abgesetzt wurden, zu einem deutlichen Anstieg der Insulinbindungskapazität, die nach Wiedereinsetzen der Biguanide in jedem Fall reversibel wäre, noch fällt die Insulinbindungskapazität insulinresistenter Fälle, die noch nie Biguanide erhalten hatten, unter Buformin signifikant ab.
Die Interpretation wird etwas leichter wenn man den Verlauf der Insulinbindungskapazität in jenen Fällen verfolgt, bei denen - teils unter ambulanter und teils unter stationären Verhältnissen - regelmäßige Kontrollen der Insulinbindungskapazität ohne Änderung der Therapie vorgenommen wurden. Es zeigte sich nämlich, daß auch in diesen Fällen Schwankungen

der Insulinbindungskapazität zu verzeichnen sind, die keiner eindeutigen Tendenz folgen. Es kommt sowohl zu einem Abfall der Insulinbindungskapazität, gemessen in vierwöchentlichen Abständen, als auch in vielen Fällen zu einem Anstieg, während sich bei anderen Patienten die Insulinbindungskapazität nicht wesentlich ändert.

Auf Grund der willkürlichen Schwankungen der Insulinbindungskapazität in der unbehandelten Kontrollgruppe, kann man aus den Schwankungen in der mit Biguanid behandelten Gruppe keine Schlüsse auf eine etwaige Wirkung der Biguanide auf die immunologischen Vorgänge ziehen.
Die geschilderten Spontanschwankungen der Insulinbindungskapazität hängen wahrscheinlich eng mit der Tatsache zusammen, daß mit der von uns angewendeten Methode nur der freie Anteil des Antikörpers, und nicht auch gleichzeitig der gebundene Insulinantikörper erfaßt werden kann. Es ist leicht vorstellbar, daß je nach Dissoziationsgrad des Insulinantikörper-Komplexes bei verschiedenen Zeiten und Mengen der Insulininjektion, unterschiedliche Mengen freien Insulinantikörpers im Serum vorhanden sind. Danach wären also Effekte auf die Produktion von Insulinantikörpern nur dann verläßlich zu registrieren, wenn es gelänge, den gesamten Insulinantikörper - also auch den am Insulinmolekül haftenden Antikörperanteil - zu bestimmen. Eine Methode, die die Trennung des Insulinantikörpers ermöglicht, ist erst nach Beendigung unserer Versuchsreihe von Grodsky (77) entwickelt worden. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, alle vier Parameter - das freie Insulin, das antikörpergebundene Insulin, den freien Antikörper und den gesamten Antikörper - zu bestimmen.

Ebensowenig, wie eine deutliche Beeinflussung des Antikörpertiters durch Biguanide festgestellt wurde, konnte in unseren Untersuchungen eine Beziehung zwischen dem Verlauf

der Insulinbindungskapazität und dem Verlauf der durchschnittlichen Blutzuckerwerte, bzw. der Harnzuckerausscheidung nachgewiesen werden. In vielen Fällen war trotz Besserung der Blutzuckerwerte und der Harnzuckerausscheidung ein Anstieg der Insulinbindungskapazität festzustellen, desgleichen war eine Verschlechterung der Stoffwechsellage nicht immer von einem Anstieg der Insulinbindungskapazität begleitet. Auch diese fehlende Korrelation kann damit erklärt werden, daß die angewandte Methode keinen wirklichen Aufschluß über die wahre Größe des Insulinantikörper - Titers zu geben vermag.

Die großen Spontanschwankungen der Insulinbindungskapazität zu den verschiedenen Bestimmungszeitpunkten können jedenfalls nicht durch methodische Fehler erklärt werden. Eine Qualitätskontrolle an zehn verschiedenen Seren, bei denen die Insulinbindungskapazität mehrfach, zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurde, ergab einen mittleren Fehler von 12,3%. Außerdem war es durch eine Verbesserung der Auswertung der gewonnenen Meßpunkte möglich, die Methode erheblich zu verfeinern: während nach Kerp u.a. (70,69,71) die Bestimmung der maximalen Insulinbindungskapazität mit graphischen Mitteln erfolgte, haben wir eine Methode entwickelt, die es erlaubt die Insulinbindungskapazität ohne die Fehler einer oftmals willkürlichen Extrapolation, wie es bei der graphischen Darstellung der Meßpunkte vorkommen kann, zu ermitteln.

Als interessanter Nebenbefund unserer Untersuchungen ist festzustellen, daß sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (Tab.I,IV) bei gleichbleibenden Insulindosen ein günstiger Einfluß der zusätzlichen Biguanidapplikation auf die Größe der Blutzucker- und Harnzuckerwerte feststellen läßt. Dieses ist auch aus folgenden Gründen bemerkenswert: einmal wird immerwieder an dem Wert einer zusätzlichen Biguanidtherapie an dafür geeigneten Fällen

gezweifelt und zum andern kann die in dieser Studie gegebene Biguaniddosis keinesfalls als stets ausreichend für optimale Blutzucker- und Harnzuckerwerte angesehen werden. Wenn dennoch mit dieser lediglich für die immunologische Fragestellung gewählten Dosis von 200 bis 400mg Buformin täglich bereits in den meisten Fällen eine Stoffwechselbesserung zu verzeichnen war, dann ist zu erwarten, daß in vielen Fällen mit durchaus möglichen und wünschenswerten, hohen Biguaniddosen ein noch günstigerer Effekt auf die Stoffwechselsituation erreicht werden kann.

VI. Zusammenfassung

Bei 37 Patienten wurde vor und nach Biguanid-Therapie die Größe der maximalen Insulinbindungskapazität bestimmt. Als Kontrolle diente eine etwa gleich große Gruppe von Patienten mit etwa gleicher Größe des Insulinbedarfs, bei der in gleichen Abständen, wie bei der Versuchsgruppe, Bestimmungen der Insulinbindungskapazität vorgenommen wurden. Sowohl bei der Biguanidgruppe, als auch bei der Kontrollgruppe waren erhebliche Schwankungen der Insulinbindungskapazität zu den verschiedenen Bestimmungszeitpunkten zu verzeichnen. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich darin zu suchen, daß mit Hilfe der angewandten Methode nur der freie Anteil des Antikörpers - und nicht der gesamte Insulinantikörper - bestimmt werden konnte. Unsere Untersuchungen lassen keine Schlüsse auf einen möglichen Angriffspunkt der Biguanide an immunologischen Vorgängen zu. Hingegen konnte, auch mit geringen Dosen, ein deutlicher, günstiger Einfluß der Biguanide auf die Stoffwechsellage der meisten, untersuchten Patienten festgestellt werden.

Herrn Professor Dr. H. Mehnert danke ich für die Überlassung des Themas und sein großes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. K.-H. Dehmel für sein großes Interesse und seine tatkräftige Unterstützung.

Ich danke Herrn Professor Dr. O. Wieland, daß er mir die Möglichkeit gab meine Untersuchungen an seinem Institut durchzuführen. Herrn Oberphysikrat Dr. Czempiel und Herrn Dr. Henftling (ärztlicher Leiter der Isotopen - Abteilung des Krankenhauses München - Schwabing) bin ich für die Erlaubnis dort arbeiten zu dürfen zu Dank verpflichtet.

Herrn Dipl.-Math. Dr. E. Jörn danke ich für die mathematische Auswertung meiner Ergebnisse.

VII. Literaturverzeichnis

1. MARTIN, W.P., H.E. MARTIN, R.W. LYSTER und S. STROUSE:
J. clin. Endocr. 1,387. 1941.

2. DITSCHUNEIT, H. u. K. FEDERLIN:
Beitrag zur Pathogenese der Insulinresistenz. Dtsch. med. Wschr. 91,853. 1966.

3. FIELD, J.B.:
Insulin resistance in diabetes. Ann. Rev. Med. 13, 249. 1962.

4. TCHOBROUTSKY, G.:
Insulino-resistance. Anticorps anti-insuline chez l'homme. Path. -Biol. Vol. 14, 619. 1966.

5. KRAUS, B.:
Untersuchungen zur Häufigkeit und Behandlung der Insulinresistenz. Inaugural-Dissertation, München 1969.

6. MEHNERT, H., H. FÖRSTER:
Stoffwechselkrankheiten, Thieme Verlag Stuttgart, 179-191. 1970.

7. DAWECKE, H. u. J. BACH:
Neue Erkenntnisse in der Behandlung der chronischen Insulinresistenz und experimentellen Untersuchung zu ihrer Genese. Klin. Wschr. 41, 257-264. 1963.

8. FIELD, J.B.:
Studies on steroid treatment of chronic insulin resistance. Diabetes 11, 165-170. 1962.

9. KLEEBERG, J., D. DIEUGOTT u. J. GOTTFRIED:
A case of insulin resistance treated with corticotropin. J. clin. Endocr. 16, 680-686. 1959.

10. OAKLEY, W., J.B. FIELD, G.E. SOWTON, B. RIGBY u. A.C. CUNLIFFE:
Action of prednisone in insulin-resistant diabetes. Brit. med. J., 1601-1606. 1959.

11. COVELESS, M.H. u. J.R. CANN:
Distribution of blocking antibody in human serum proteins fractionated by electrophoresis convection. J. Immunol. 74, 329-339. 1955.

12. FRIEDLANDER, E.O. u. M.D. BRIGANT:
Idiopathic insulin-resistant diabetes mellitus. Amer. J. med. 26, 139-145. 1959.

13. YELLER, W., J.S. LA DUE u. G. B. GLASS:
Insulin-resistant diabetes precipitated by cortisone and reserved by nitrogen mustard. A.M.A. Arch. Int. med. 87, 124-127. 1951.

14. HASSELBLATT, A. u. J. Schmietta:
Aktivierung von gebundenem Insulin durch Tolbutamid. Klin. Wschr. 39, 910-911. 1961.

15. K.H. DEHMEL, B. KRAUS, H. KUHLMANN u. H. MEHNERT:
Klinische Erfahrung bei der Beeinflussung der Insulinresistenz durch orale Antidiabetika. 3. Kongress d. Dtsch. Diabetes Gesellschaft, Göttingen 7.-8. Juni 1968.Abstr. Diabetol. 1968.

16. BERSON, A.:
Insulinhemmer und Insulinresistenz. Insulinresistenz und Insulinantikörper. New York State J. med. Nov.15, 1960.

17. WATANABE, C.K.:
Studies in the metabolic charges induced by administration of guanidin bases. I. Influence of injected guanidine hydrochloride upon blood suger content. J. Biol. Chem. 33, 253. 1918.

18. SÖLING, H.D., W.CREUTZFELDT und H. WERCHAU:
Untersuchungen zur Stoffwechselwirkung von blutzuckersenkenden Biguaniden bei verschiedenen Tierspezies. Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharm. 244,290. 1963.

19. STERNE, J. and D. DUVAL:
Effekts Hypoglyceminantes de la N-N-Dimethyldiguanide. In: Diab. mell. III. Kongr. d. Internat. Fed., Düsseldorf, S.443. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959.

20. OTTO, H.:
Untersuchungen mit Phenyla etylbiguaniden (DBI) bei stoffwechselgesunden Menschen. In: Bertram, F. u. G. Michael: Internat. Big. Symp. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1960.

21. GUTSCHE, H.:
Beeinflußung des Staub-Traugott-Effektes bei Biguanidbehandlung. In: Bertram, F. u. G.Michael: Internat.Big.Symp.Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1960.

22. MADISON, L.L. und R.H. UNGER:
Effekt of Phenformin on peripheral Glucose Utilization in Human Diabetic and non Diabetic Subjects. Diabetes 9, 202. 1960.

23. MICHEL, W.:
Akute Belastung mit Biguaniden bei Gesunden und Diabetikern. In: Bertram,F. und G.Michael: Internat. Big.Symp. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1960.

24. BECKMANN, R.:
Zur Pharmakodynamik der Biguanide. 2. Internat.Big.Symp., Düsseldorf 1967.

25. JAHNKE, K., H.DAWEKE, H.LIEBERMEISTER, W.SCHILLING u. D. GRÜNEKLEE:
Über den Einfluß von Buformin auf das Verhalten von Gewicht und Stoffwechselmetaboliten bei Fettsüchtigen mit und ohne Störung der Glukosetoleranz. 2. Internat.Big.Symp., 1967 Düsseldorf.

26. HIRSCH-KAUFFMANN, H. und A. WAGNER:
Zur Frage der Milchsäureproduktion bei Synthalingebrauch.Klin.Wschr. 7,1866.1928.

27. CREUTZFELDT, W.,A.APPELS, R.KATTERMANN, H.FRERICHS, H. PROSCHEK, K.HUBRICH und H.D. SÖLING:
Zur Wirkung von Buformin mit und ohne Kombination von Sulfonylharnstoffen auf Gewicht und verschiedene Stoffwechselgrößen bei Diabetikern.2.Internat.Big.Symp., 1967 Düsseldorf.

28. TRANQUADA, R.E., C.KLEEMANN und J.BROWN:
The acute effekts of DBI on human hepatic.Intermed. Metabolism clin. Res.7,110.1959.

29. CRAIG, J.W., M.MILLER,H.WOODWARD jr. and E.MERIK:
Influence of phenethylbiguanide on lactic pyruvic and citric acids. In: Diabetic Patients.Diabetes 9, 186,1960.

30. KATTERMANN R.,A.APPELS, H.PROSCHEK, K.HUBRICH and W. CREUTZFELDT:
Controlled comparative study on the effect of diet, N_1,n-Butylbiguanide and tolbutamide on levels of lactate, pyruvate,ketone-bodies and lipids in serum. 6th Congr. of the internat.diab.fed.,exc.med., internat.congress series,140,42. 1967.

31. STAUB,H. und A.JELZER:
Zum Synthalinmechanismus.Klin.Wschr.7, 1365.1928.

32. HOLLUNGER,G.:
Guanidines and oxidative phosphorylation.Acta Pharm. et. Tox.11,Suppl.1, 7.1955.

33. FALCONE,A.B., R.L.MAO and E.SHRAGO:
A study of the action of hypoglycemiaproducing biguanide and sulfonylurea compounds on oxidativephosphorylation. J.Biol.Chem. 237,904.1962.

34.SCHÄFER,G.:
Oligomycinähnliche Effekte von Biguaniden.Biochem.7,339,46.1963.

35. PRESSMANN,B.C.:
The effekts of guanidine and alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria.J.Biol. Chem. 238,401.1963.

36.TRANQUADA,R.E., S.BERNSTEIN and H.E.MARTIN:
Irreversible lactic acidasis associated with Phenformintherapie. J.Amer.Med.Assoc. 184,37.1963.

37. BERNIERS,G.M.,Ch.S.SPRINGATE and M.MILLER:
Lactic acidosis and phenethylbiguanide. J.Amer.Ass.184,47.1963.

38. CLARK,G.A.:
Interrelation of parathyroids,suprarenals and pancreas.J.Physiol. 58,294.1923/24.

39. MINOT,A.S.:
The mechanism of the hypoglycemia induced by guanidine and carbon tetrachloride poisoning and its relief by calcium modication. J.Pharm.Exp.Therap. 43,295.1931.

40. HUNASAKO,H.:
Einfluß des Synthalins auf den Kohlenhydratstoffwechsel des Kaninchens. Mitt.Med.Akad.Kioto 28,1107.1940.

41. CREUTZFELDT,W., UND ,E.TECKLENBOURG:
Experimentelle Untersuchungen zur Funktion der A-Zellen der Pankreasinseln und zur Glucagonwirkung. Arch.Exp.Path.Pharm.277,23,1956.

42. HESSE,E. und G.TAUBMANN:
Wirkung des Biguanids und seiner Derivate auf den Zuckerstoffwechsel. Arch. exp. Path. Pharm. 142, 290, 1929.

43. UNGAR, G.L.FREEDMAN and S.L.SHAPIRO:
Pharmacoligal studies of a new hypoglycemic drug.Proc.Soc.Exp.Biol. 95,190,1957.

44. STEINER,D.F. und R.H.WILLIAMS:
Actions of phenethylbiguanide and related compounds. Diabetes 8,154, 1959.

45. CREUTZFELDT,W. und A.MOENCH:
Vergleichende Untersuchungen mit den blutzuckersenkenden Guanidinderivaten Synthalin B und Phenylaethyldiguanid DBI (Ein Beitrag zur Frage der sog. A-Zellgifte). Endocrinologie 36,167,1958.

46. WILLIAMS, R.H., J.M.TYLERGHEIN, P.M.HYDE and R.L.NIELSEN:
Studies related to the hypoglycemic action of phenylaethyldiguanide metabolism.6,311,1957.

47. BERINGER,A.,K.HUPHA, K.MÖRSLACHER,K.MOSER und R.WENGER:
Zur Beeinflussung des menschlichen Diabetes mit Insulin, blutzuckersenkenden Sulfonamiden sowie den Biguaniden. Wien med.Wschr.108,639, 1958.

48. SÖLING, H.D.,R.ZAHLTEN, M.BÖTTCHER and B.WILLIAMS:
Effect of ß-N_1-Phenaethylbiguanide (DBI) on the metabolism of the isolated rat.Fat.pad.. Diabetologica 3, 377,1967 b.

49. FORBATH, N. and D.W.CLARKE:
The effect of phenaethylbiguanide upon the metabolism of the isolated rat diaphragm. Canad. J. Biochem. Physiol. 37,881. 1959.

50. BOLINGER, R.E., W.P.MC KEE and J.W.DAVIS:
Comparative effects of DBI and insulin on glucose uptake of rat diaphragm metabolism. 9,30. 1960.

51. UNGAR, G., L.FREEDMAN and S.L.SAPHIRE:
Pharmacology and toxicology of phenaethylbiguanide (DBI). Symposium on " A new hypoglycemic agent phenformin (DBI)". Houston Texas. 1959.

52. STEINER,D.F. und R.H.WILLIAMS:
The effect of biguanide compounds upon respiratory enzyms. Clin. Res. 6,55,1958.

53. DITSCHUNEIT, H. und F.HOFF:
Zum Problem des Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Guanidinderivate. New Istanbul Contribution to Clinical Science. 7, 106. 1964.

54. RAFAELSEN, O.J.:
Action of oral antidiabetica drugs on the carbohydrate metabolism of isolated rat diaphragm. In Diabetes mellitus. II. Kongress der Internat. Diabetes Federation Düsseldorf, Georg Thieme 'erlag, Stuttgart. 1959.

55. DITSCHUNEIT H. und H.H. DITSCHUNEIT,
unveröffentliche Untersuchung.

56. BUTTERFIELD, J., J.K. FRY and M.J. WICHELOW:
The hypoglycemic action of phenformin. Studies in Diabetes after short - term therapy. Lancet II, 563. 1961.

57. DAWECKE, H. und I. BACH:
Experimental studies on the action of biguanides metabolism. 12, 319. 1963.

58. LIPPMANN, H.G.:
Tierexperimentelle Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von N_1-N-Butylbiguanid. Habil. Schrift Med. Fakultät, Berlin 1963.

59. BECKMANN, R.:
Zum Wirkungsmechanismus der Biguanide. Dtsch. med. Wschr. 90. 1589, 1965.

60. FORBATH, N. and D.W.CLARKE:
Factors influencing the distribution of pentoses in isolated rat diaphragm. Canad. J. Biochem. 38, 113. 1960.

61. PARK, C.R., J.BORNSTEIN and R.L.POST:
The effect of insulin on free glucose content of rat diaphragm. Amer. J. Physiol. 182,12. 1955.

62. WILLIAMSON J.R., R.S.WALKER and A.E.REROLD:
Metabolic effects of phenethylbiguanide (DBI) on the isolated perfused rat heart. Metabolism 12, 1141. 1963.

63. BUTTERFIELD, W.J.:
Insulinclearance - Untersuchung am Unterarm. Apals of the New Acad. of Science 148, Art.III, 724-733, 26, 1966.

64. TRANQUADA, R.E. and A.B. BENDER:
In vitro metabolic studies with DBI on rat diaphragm and adipose tissue. Clin. Res. 10,90. 1962.

65. MEHNERT, H.:
Experimentelle und klinische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus und Indikationsbereich blutzuckersenkender Biguanidderivate. Habil. Schrift, München,1963.

66. DITSCHUNEIT, H.W., H.ROTT und J.-D. FAULHABER:
Effekt von Biguaniden auf den Stoffwechsel isolierter Fettzellen. 2. Internat. Big. Symposium, Düsseldorf, Georg Thieme Verlag, 1967.

67. MOHNIKE,G.:
L'etude du mechanisme d'action derivès de la guanidine. Journeès annuelles de diabetologie de l'Hotel Dieu Paris, 1963.

68. HILL J.B.:
The adsorption of J-131-insulin to glass. Endocrinology 65,515. 1959.

69. KÜHNAU, J.jr.:
Die Bedeutung humoraler Insulinantikörper für die Insulinansprechbarkeit bei Diabetes mellitus und die Konsequenzen für die Therapie. Habil. Schrift, Hamburg. 1968.

70.KERP, L.:
Insulinbindende Antikörper, experimentelle undklinische Untersuchung. In: Verh. Dtsch. Ges. Allergie- und Immunitätsforsch. X.Kongress, Bd II, 1966, Stuttgart Schattauer, 1968.

71. BERSON, S.A., R. YALOW:
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J.Clin. Invest. 38, 1996-2016, 1959.

72. KERP, L., H.KASEMIR und F. KIELING:
Insulinbindende Antikörper und Insulinbedarf bei Diabetikern. Klin. wschr. 46, 376, 1968.

73. KERP, L., W.CREUTZFELDT und S. STEINHILBER:
Wird die Insulin-Antikörperbindung durch Tolbutamid in vitro beeinflußt? In: Fortschritte der Diabetesforschung;hrsg. von Oberdisse, K. und J.Jahnke, Thieme Verlag - Stuttgart,1963.

74. DAWECKE, H.:
Klinik der Insulinresistenz.Dtsch. Med. Wschr. 91, 937-978, 1966.

75. SCATCHARD,G., J.S. COLEMON und A.L. SHEN:
Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. J.Amer.Chem.Soc. 79,12 - 20, 1957.

76. CZYZYK,A., J.LAWECKI, J. SADOWSKI, I.PONIKOWSKA, Z. SZCZEPANIK:
Effekt of biguanides on intestinal absorption of glucose. Diabetes 17, 492, 1968.

77. GRODSKY,G.M.:
Persönliche Mitteilung.

78. ALTSCHULD,R.A., F.A.KRUGER:
Inhibition of hepatic gluconeogenesis in guinea pig by phenformin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 148, 612, 1968.

VIII. Lebenslauf

Am 19. April 1944 wurde ich als Sohn des Internisten Dr. med. Josef Hiltensperger und seiner Frau Maria, geborene Niggl, in Murnau geboren.
Von 1950 bis 1955 besuchte ich die Volksschule an der Simmernstraße in München, 1955 trat ich in das Alte Realgymnasium München über, wo ich 1965 das Reifezeugnis erwarb. Nach einem Semester Naturwissenschaften begann ich das Studium der Medizin an der Universität München und bestand dort im Frühjahr 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Herbst 1968 die ärztliche Vorprüfung. Nach elf Studiensemestern beabsichtige ich im Herst 1971 das medizinische Staatsexamen abzulegen.